

## SINTESIS ASKORBIL LAURAT DARI METIL LAURAT DAN ASAM ASKORBAT MELALUI REAKSI TRANSESTERIFIKASI DENGAN KATALIS LIPASE SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

### SYNTHESIS OF ASCORBYL LAURATE FROM METHYL LAURATE AND ASCORBIC ACID THROUGH TRANSESTERIFICATION WITH CATALYST IS LIPASE AND ANALYSIS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY

Dyah Adyana\*, Daniel dan Chairul Saleh

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman

\*Corresponding Author: [dyah.adyana@yahoo.com](mailto:dyah.adyana@yahoo.com)

Submit : 01 Maret 2017 Accepted : 02 Mei 2017

#### ABSTRACT

*Antioxidant are defined as compound that is capable of delay, postpone or prevent oxidation reaction, such as on foods and drugs. Antioxidant can be found in nature but the used is relatively limited because hydrophilic. This research aims to modified natural antioxidant so as be used in lipophilic media. Methyl laurate is one of a fatty acid ester potentially can be used in industry. Modified were made by synthesise of methyl laurate and ascorbic acid through transesterification with catalyst is lipase from sesame seeds (*Sesamun indicum L.*) in a organic solvent such as acetone. Transesterification process does on reacton time at 36 hours at temperature (40-50) °C and pH is 7 so has yield produced is 53,89 %. The result is ascorbyl laurate identified of the functional groups using by FT-IR spectrophotometer. Based on the result identification of the functional groups by FT-IR spectrophotometer, then do the analysis of antioxidant activity with a Radical Reduction Method DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Antioxidant activity value  $IC_{50}$  is 40,57 ppm. This result indicated the potential of ascorbyl laurate as antioxidant.*

**Keywords:** Core Methyl Laurate, Transesterification, Ascorbyl Laurate, Antioxidant Activity Test and DPPH Method.

#### PENDAHULUAN

Istilah antioksidan dewasa ini sudah dikenal bagi masyarakat Indonesia. Berbagai macam produk olahan baik makanan, minuman serta produk kecantikan terdapat kandungan antioksidan. Antioksidan diketahui memiliki pengaruh positif untuk kesehatan manusia. Selain itu antioksidan memiliki kemampuan menetralkan radikal bebas.

Antioksidan yaitu senyawa yang dapat menghambat oksidasi dari molekul lain. Didalam tubuh manusia tidak memiliki sistem pertahanan antioksidatif sehingga jika tubuh terkena paparan radikal yang berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan dari luar (eksogen). Berdasarkan sumber dari antioksidan, antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik.

Antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang dibuat dari bahan kimia. Antioksidan sintetik dikhawatirkan memiliki efek samping yang belum diketahui sehingga lebih baik digunakan

antioksidan alami. Asam askorbat merupakan salah satu antioksidan alami yang larut dalam air dengan kelarutan 200 g/L pada temperatur 25°C[1]. Modifikasi asam askorbat yang tidak larut dalam senyawa non polar salah satunya minyak yaitu melalui reaksi esterifikasi atau transesterifikasi dengan asam lemak [2]. Hasil reaksi dari asam lemak dan asam askorbat yaitu ester askorbil asam lemak yang diharapkan memiliki sifat tidak mengubah aroma, rasa dan warna[3].

Salah satu asam lemak yaitu asam laurat atau asam dodekanoat, asam laurat memiliki 12 atom karbon (C), 24 atom hidrogen (H), 2 atom oksigen (O) dan berat molekul 22,32. Asam laurat berbentuk padatan (kristal) seperti jarum, berwarna putih dan meleleh pada suhu sekitar 44 °C. Didalam tubuh, asam laurat memiliki fungsi sebagai antimikroba, antivirus dan antipprotozoa sehingga dapat meningkatkan kekebalan tubuh seperti memberikan perlindungan dari virus HIV dan herpes serta bakteri patogen[4].

Dengan demikian dilakukannya modifikasi penelitian tentang sintesis askorbil asam lemak yaitu askorbil laurat dari metil laurat dan asam askorbat melalui reaksi transesterifikasi dengan katalis enzim lipase serta uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH untuk memodifikasi asam askorbat agar dapat larut dalam lemak terutama asam lemak jenuh rantai sedang dan dapat disintesis oleh tubuh sebagai cadangan antioksidan.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu alas datar leher tiga, pendingin bola, pipet tetes, pipet volume, bulp, gelas ukur, gelas beaker, termometer, corong pisah, spatula, batang pengaduk, Erlenmeyer, labu ukur, corong kaca, timbangan analitik, *hot plate*, magnetik stirer, klem, tiang statif, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *stopwatch*, inkubator, refrigerator, piknometer 5 mL, *rotary evaporator*, Spektrofotometer VIS 7220 G Merek Rayleigh dan Spektrofotometer FT-IR.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Asam Laurat p.a 99%, metanol p.a,  $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{p})}$ , aseton p.a,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat, etanol p.a, asam askorbat (Vitamin C), kloroform p.a, benzene, *n*-heksan, ekstrak kasar enzim lipase dari biji wijen, DPPH, Buffer posfat pH 7, vaselin, alkohol 95% dan aquadest.

## PROSEDUR PENELITIAN

### Esterifikasi Asam Laurat

Pada tahap ini digunakan katalis  $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{p})}$  1% b/b dengan ratio molar metanol dengan asam laurat (6:1) pada suhu (60-70) °C selama 4 jam. Sebanyak 20,62 gram asam laurat dimasukkan kedalam labu alas leher tiga dan ditambahkan dengan 50 mL benzene yang dihubungkan dengan alat pendingin bola yang dilengkapi dengan pengaduk magnet, termometer dan es pendingin untuk labu. Kemudian sambil diaduk dengan pengaduk magnet ditambahkan campuran metanol (ratio molar 6). Lalu melalui corong penetes, ditambahkan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{p})}$  sambil diaduk dalam keadaan dingin dan direfluks selama 4 jam. Hasil reaksi kemudian dipisahkan dengan corong pemisah, diambil fase atas larutan. Kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* Filtrat dilarutkan dengan 50 mL *n*-heksan, dicuci dengan menggunakan aquades dan dihilangkan airnya dengan menambahkan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat dan

disaring. Kemudian pelarut diuapkan kembali dengan *rotary evaporator*. Residu yang diperoleh merupakan metil ester asam laurat (metil laurat). Lalu metil laurat yang terbentuk diidentifikasi gugus fungsinya dengan menggunakan Spektrofotometer FT-IR.

### Preparasi Lipase

Lipase diisolasi dari ekstrak kasar biji wijen yang mengacu pada penelitian Arbianti, dkk. (2008) [5]. Biji wijen dicuci dengan aquades hingga bersih dan tidak ada pengotor. Lalu biji wijen di oven pada suhu (30-40) °C selama 8 jam untuk menghilangkan kadar air di dalam biji wijen. Biji wijen dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi serbuk kemudian diayak dengan menggunakan ayakan 50 mesh. Serbuk biji wijen merupakan lipase yang digunakan sebagai katalis dalam reaksi sintesis askorbil laurat.

### Sintesis Askorbil Laurat

Askorbil laurat disintesis dari metil laurat dan asam askorbat dengan perbandingan ratio molar 1:4 pada suhu (40-50) °C selama 36 jam. Sintesis askorbil laurat diacu berdasarkan penelitian Lestari Puji, dkk. (2012) [4]. Pada tahap ini, digunakan katalis enzim dari ekstrak kasar biji wijen sebanyak 70% dari substrat. Mula-mula sebanyak 8,57 mL metil laurat dimasukkan kedalam labu alas leher tiga yang dihubungkan dengan alat pendingin bola yang dilengkapi dengan pengaduk magnet, termometer dan es pendingin untuk labu dan ditambahkan 50 mL aseton. Kemudian sambil diaduk dengan pengaduk magnet ditambahkan kedalam campuran asam askorbat sebanyak 28,1792 gram (ratio molar 4). Lalu, melalui corong penetes, ditambahkan buffer posfat pH 7 sebanyak 8 tetes dan katalis lipase dari ekstrak kasar biji wijen sebanyak 70% dari substrat. Campuran reaksi direfluks selama 36 jam dengan suhu (40-50) °C.

Ester askorbil laurat hasil reaksi kemudian dimurnikan. Pemurnian diadaptasi dari hasil penelitian Bradoo, dkk (1999) [6] termodifikasi. Campuran reaksi dipisahkan dari enzim ekstrak kasar biji wijen dengan cara menyaring campuran. Filtrat yang dihasilkan berupa campuran asam askorbat, metil laurat dan produk reaksi berupa askorbil laurat. Pelarut aseton dihilangkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Sisa hasil reaksi berupa asam askorbat, metil laurat dan askorbil laurat. Lalu kedalam campuran tersebut ditambahkan 15 mL kloroform. Kloroform melarutkan ester askorbil laurat dan metil laurat.

Campuran tersebut disaring dan filtratnya diuapkan kembali dan akan didapatkan ester askorbil laurat. Lalu dihitung % rendemen hasil sintesis. Untuk mengetahui gugus fungsi dan kerangka struktur dari produk yang dihasilkan digunakan spektrofotometer FT-IR.

### Uji Aktivitas Antioksidan

Uji peredaman pereaksi DPPH dilakukan dengan mengacu pada metode (Bouftira, 2007) [7] menggunakan spektrofotometer visibel pada suhu kamar (25°C) pada panjang gelombang optimum dan larutan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) digunakan sebagai radikal bebas serta vitamin C sebagai pembanding.

### Analisis Data

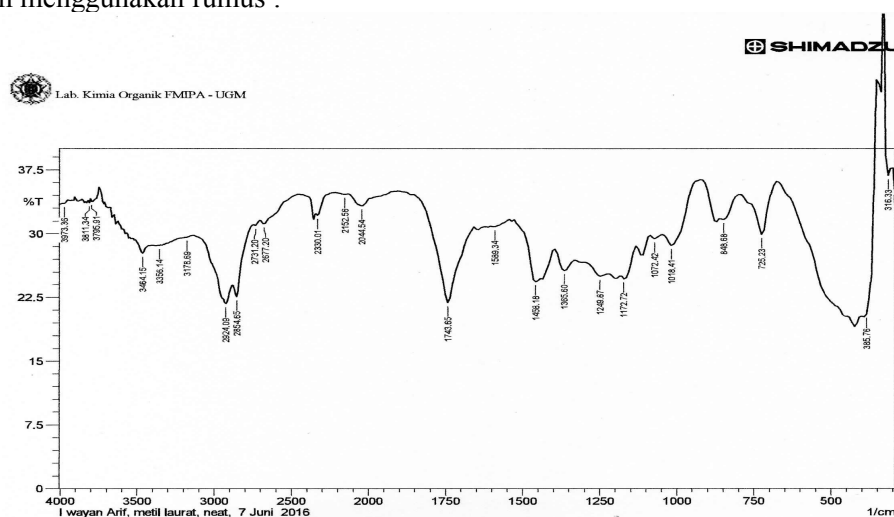
Presentase aktivitas antioksidan dari ekstrak dalam menangkap atau meredam radikal bebas DPPH yang dinyatakan dalam % inhibisi, yang diperoleh dengan menggunakan rumus :

Nilai  $IC_{50}$  dihitung masing-masing dengan menggunakan rumus persamaan regresi linear yaitu  $y = ax + b$ . Dimana sumbu x adalah konsentrasi dan sumbu y adalah % inhibisi. Dengan nilai y adalah sebesar 50 dan nilai x sebagai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  ini menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pembuatan Metil Ester Laurat (Metil Laurat)

Berdasarkan hasil reaksi, metil laurat yang dihasilkan berupa cairan berwarna bening dan bau yang khas dengan persen rendemen yang besar yaitu 90,72%. Hal ini menunjukkan bahwa metil laurat dari reaksi esterifikasi asam laurat dan metanol dapat terbentuk dengan baik.



Gambar 1. Spektrum FT-IR Metil Laurat.

Metil laurat dianalisis dengan spektroskopi FT-IR untuk mengetahui gugus fungsinya. Hasil analisis spektroskopi FT-IR metil laurat dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil analisis spektroskopi FT-IR dari metil laurat memberikan spektrum dengan puncak serapan pada bilangan gelombang 2854,65  $cm^{-1}$  menunjukkan serapan khas dari vibrasi *stretching* C-H  $sp^3$  yang didukung oleh puncak vibrasi pada daerah bilangan gelombang 1458,18  $cm^{-1}$  dan 1365,80  $cm^{-1}$  yang menunjukkan serapan khas dari vibrasi *bending* C-H  $sp^3$ . Pada bilangan gelombang 1743,65  $cm^{-1}$  menunjukkan serapan khas gugus karbonil (C=O) dan pada bilangan gelombang 1172,72  $cm^{-1}$  menunjukkan serapan khas gugus C-O-C yang menunjukkan adanya ester.

Tabel 1. Interpretasi Spektrum Inframerah Bilangan Gelombang dan Penempatan Gugus Terkait dari Metil Laurat.

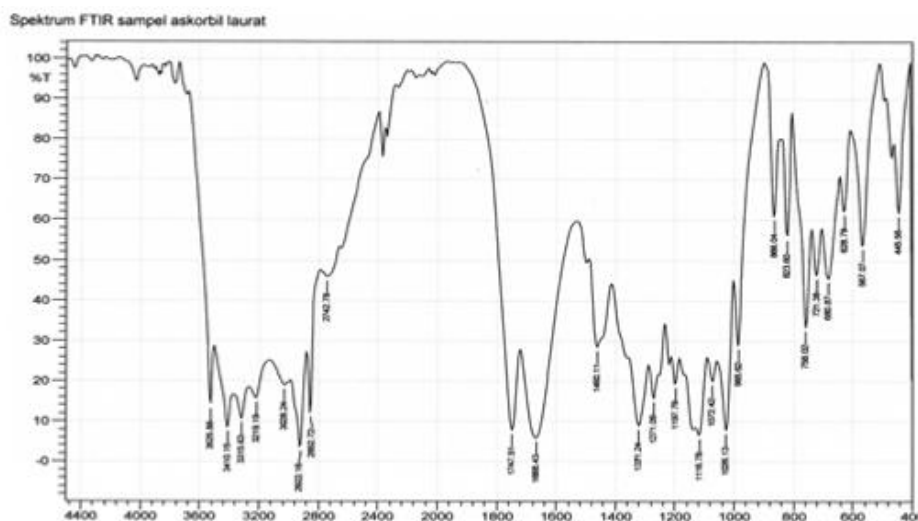
No.	Bilangan gelombang (v, $cm^{-1}$ )		Penempatan Gugus Terkait
	Spektra	Literatur	
1.	2854,65	3000-2850	$\nu$ C-H (pada $CH_2$ )
2.	1743,65	1730-1750	$\nu$ C=O ester
3.	1458,18	1470-1450	$\gamma$ C-H (pada $CH_2$ )
4.	1365,80	1375	$\gamma$ C-H simetri (pada $CH_3$ )
5.	1172,72	1000-1300	$\nu$ C-O-C

(Data Hasil Penelitian, 2016)

### Pembuatan Askorbil Laurat dari Metil Laurat

Askorbil Laurat yang dihasilkan berupa cairan berwarna kuning dan berbau khas dengan persen rendemen yaitu sebesar 53,89%. Hal ini menunjukkan bahwa askorbil laurat terbentuk dengan baik. Tahapan awal reaksi yaitu askorbil laurat direaksikan dengan asam askorbat (vitamin C) dengan katalis lipase dan dalam pelarut aseton.

Pada tahapan reaksi transesterifikasi-enzimatis ini, produk yang dihasilkan berupa askorbil laurat dan pelarut. Produk askorbil laurat dianalisis dengan spektroskopi FT-IR untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada askorbil laurat sehingga dapat dibandingkan dengan gugus fungsi yang terdapat pada metil laurat dan asam askorbat. Hasil analisis spektroskopi FT-IR askorbil laurat dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Spektrum FT-IR Askorbil Laurat

Hasil analisis spektroskopi FT-IR dari askorbil laurat memberikan spektrum dengan puncak serapan pada bilangan gelombang 3525,88  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan khas dari vibrasi stretching O-H. Pada bilangan gelombang 2922,16  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan khas dari C-H alkana. Pada bilangan gelombang 1668,43  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan khas dari senyawa alkena (C=C). Pada bilangan gelombang 2922,16  $\text{cm}^{-1}$  dan 2852,72  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan khas dari vibrasi *stretching* C-H  $\text{sp}^3$  yang didukung oleh puncak vibrasi pada daerah bilangan gelombang 1460,11  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan serapan khas dari vibrasi *bending* C-H  $\text{sp}^3$ . Pada bilangan gelombang 1747,5  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan khas gugus karbonil (C=O) dan pada bilangan gelombang 1197,79  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan khas gugus C-O-C yang menunjukkan adanya ester. Pada daerah panjang gelombang 1371,24  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan serapan vibrasi *bending* khas gugus C-H  $\text{sp}^3$ . Pada daerah panjang gelombang 721,38  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan serapan khas dari senyawa alkana  $(\text{CH}_2)_n$  rantai lurus pada asam lemak. Interpretasi FT-IR askorbil laurat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Interpretasi Spektrum Inframerah Bilangan Gelombang dan Penempatan Gugus Terkait dari Askorbil Laurat

No.	Bilangan gelombang ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ )		Penempatan Gugus Terkait
	Spektra	Literatur	
1.	3525,88	3200-3550	$\nu$ O-H
2.	2992,16	3000-2850	$\nu$ C-H (alkana)
3.	2852,16	2850-3000	$\nu$ C-H (pada $\text{CH}_2$ )
4.	1747,51	1730-1750	$\nu$ C=O ester
5.	1668,43	1680-1600	$\nu$ C=C
6.	1460,11	1470-1450	$\gamma$ C-H (pada $\text{CH}_2$ )
7.	1371,24	1375	$\gamma$ C-H (pada $\text{CH}_3$ )
8.	1197,79	1000-1300	$\nu$ C-O-C
9.	1116,78	1100	$\gamma$ C-C-C
10.	721,38	720	$\gamma$ $(\text{CH}_2)_n$

(Data Hasil Penelitian, 2016)

### Uji Aktivitas Antioksidan

Pengukuran panjang gelombang optimum dilakukan pada panjang gelombang 510 nm sampai dengan 520 nm. Absorbansi tertinggi yang didapatkan yaitu 0,852 pada panjang gelombang 517 nm. Setelah didapatkan panjang gelombang optimum kemudian dilakukan pengukuran absorbansi blanko yang berisi 4 mL etanol dan 1 mL DPPH. Pengukuran diulang sebanyak 3 kali sehingga didapatkan rata-rata absorbansi blanko yaitu 0,793. Askorbil laurat dan vitamin C diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang optimum 517 nm. Variasi konsentrasi untuk askorbil laurat adalah 25, 50, 75

dan 100 ppm, sedangkan variasi konsentrasi untuk pembanding adalah 1; 1,5; 2 dan 2,5 ppm. Pengukuran absorbansi dilakukan pada askorbil laurat dan pembanding yang telah direaksikan dengan DPPH. Pengukuran absorbansi masing-masing konsentrasi dilakukan dengan tiga kali pengulangan sehingga diperoleh hasil rata-rata absorbansi dan kemudian dihitung nilai persentase peredaman radikal DPPH (persen inhibisi).

Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada askorbil laurat dan pembanding yaitu vitamin C dengan metode peredaman radikal bebas DPPH. Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap askorbil laurat dan vitamin C dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3. Aktivitas Antioksidan Askorbil Laurat dengan Uji Peredaman Radikal Bebas DPPH

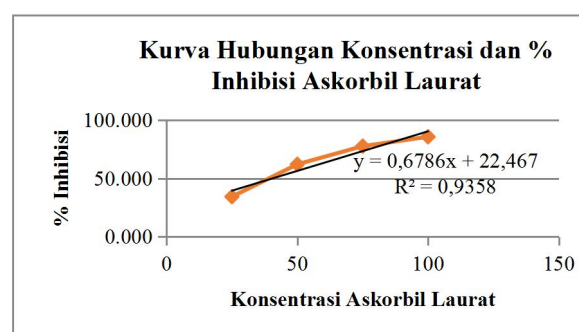
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Blanko	$\bar{A}$ Askorbil Laurat	Persen Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (ppm)
25	0,793	0,521	34,258	$y = 0,6786x + 22,467$	40,57
50		0,301	62,043		
75		0,178	77,596		
100		0,114	85,624		

Tabel 4. Aktivitas Antioksidan Vitamin C dengan Uji Peredaman Radikal Bebas DPPH

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Blanko	$\bar{A}$ Vitamin C	Persen Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (ppm)
1	0,793	0,685	13,577	$y = 9,3148x + 3,0979$	5,03
1,5		0,666	15,973		
2		0,631	20,429		
2,5		0,574	27,617		

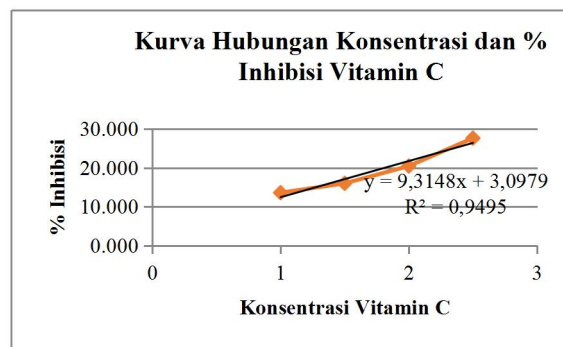
Grafik hubungan antara konsentrasi askorbil laurat dan vitamin C dengan persen inhibisi dibuat untuk memperoleh persamaan regresi linier  $y = ax + b$ , dimana sumbu x adalah konsentrasi (ppm) dan sumbu y adalah persen inhibisi (% inhibisi). Nilai IC<sub>50</sub> yang menyatakan konsentrasi askorbil laurat yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% kemudian dihitung dari persamaan regresi linear yang diperoleh.

Grafik hubungan antara konsentrasi dengan persen inhibisi askorbil laurat dapat dilihat pada Gambar 3. Dari grafik regresi linear antara konsentrasi dengan persen inhibisi askorbil laurat diperoleh persamaan regresi linear  $y = ax + b$ . Dari perhitungan pada tabel diperoleh bahwa nilai IC<sub>50</sub> askorbil laurat sebesar 40,57 ppm.



Gambar 3. Grafik Regresi Linear Antara Konsentrasi Terhadap Persen Inhibisi dari Askorbil Laurat

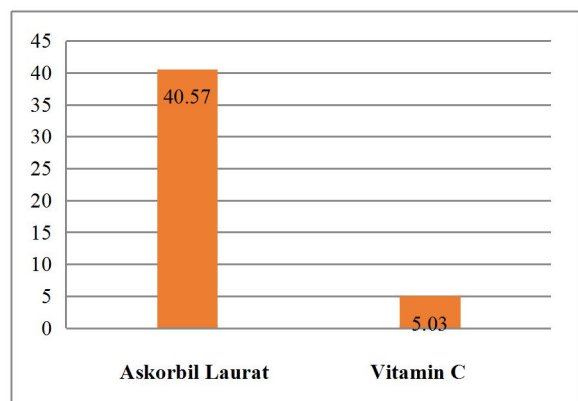
Grafik hubungan antara konsentrasi dengan persen inhibisi vitamin C dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik Regresi Linear Antara Konsentrasi Terhadap Persen Inhibisi dari Vitamin C (Pembanding).

Dari grafik regresi linear antara konsentrasi dengan persen inhibisi vitamin C diperoleh persamaan regresi linear  $y = ax + b$ . Dari perhitungan pada tabel diperoleh bahwa nilai  $IC_{50}$  vitamin C sebesar 5,03 ppm.

Nilai  $IC_{50}$  dari askorbil laurat askorbil laurat dan pembanding dengan uji peredaman radikal DPPH dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik Nilai  $IC_{50}$  Askorbil Laurat Serta Vitamin C Sebagai Pembanding.

Dari Gambar 5 dapat dilihat nilai  $IC_{50}$  pada askorbil laurat lebih kecil bila dibandingkan dengan vitamin C. Hal ini disebabkan askorbil laurat hanyalah senyawa hasil sintesis yang memiliki aktivitas antioksidan tidak terlalu besar tetapi dapat berpotensi sebagai antioksidan yang bersifat lipofilik. Sehingga vitamin C yang larut dalam lemak (askorbil laurat) dapat tertahan didalam tubuh lebih lama dan bermanfaat sebagai antioksidan. Berdasarkan kategori nilai  $IC_{50}$  pada Tabel 3 dapat disimpulkan bahwa askorbil laurat memiliki potensi sebagai antioksidan aktif dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 40,57 ppm.

## KESIMPULAN

Senyawa antioksidan askorbil laurat dapat dihasilkan melalui reaksi transesterifikasi dari

metil laurat dan asam askorbat dengan katalis lipase dalam pelarut aseton.

Berdasarkan uji aktivitas antioksidan dapat disimpulkan bahwa askorbil laurat memiliki potensi sebagai antioksidan aktif dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 40,57 ppm.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Song Q.X., Y.Zhao, W.Q. Xu, W.Y. Zhou, D.Z. Wei. (2006). *Enzymatic Synthesis of L-ascorbyl Linoleate in Organic Media*. Bioprocess Biosyst eng. 28: 211-215.
- [2] Song Q.X., D.Z. Wei, W.Y. Zhou, W.Q. Xu, S.L. Yang. (2004). *Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of L-ascorbyl Oleate and L-ascorbyl Linoleate*. Biotechnology Lett. 26: 1777-1780.
- [3] Karmee S.K., (2009). *Biocatalytic Synthesis of Ascorbyl Esters and Their Biotechnological Applications*. Appl Microbiol Biotechnol. 81: 1013-1022.
- [4] Lestari P. S., Harjono dan Supartono. (2012). *Sintesis Askorbil Laurat Melalui Reaksi Esterifikasi Dengan Katalis Enzim Lipase*. Semarang: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang.
- [5] Arbianti, R., Utami, T. S., Hermansyah, H. dan Handayani, W. (2008). *Pemanfaatan Biji Wijen Sebagai Sumber Enzim Lipase Untuk Reaksi Esterifikasi Gliserol-Asam Laurat Pada Pembuatan Agen Pengemulsi*. Prosiding Semnas Rekayasa Kimia dan Proses. 1411-4216.
- [6] Bradoo, S., R., R.K. Saxena, R, Gupta. (1999). *High yield of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification*. JAOCS. 76(11)
- [7] Bouftira, I, Abdelly C. and Sfar S. (2007). *Identification of a naturally occurring 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol from purple leaves of the halophyte plant Mesembryanthemum crystallinum*. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (9), pp. 1136-1139. ISSN 1684-5315.